

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2019.09.09

1 例血小板无力症的分子发病机制研究

高丙晶, 龚岩, 屈晨雪, 由然, 苗林子, 陆遥, 李涛 (北京大学第一医院检验科, 北京 100034)

摘要:目的 探讨 1 例血小板无力症患儿的发病原因, 阐明其致病机制。方法 收集 1 例血小板无力症患儿外周血, 通过基因测序技术明确致病基因位点; 采用 PCR 定点突变方法制备突变质粒, 转染中国仓鼠卵巢上皮细胞 (CHO-K1), 构建体外真核表达系统。用免疫印迹法检测突变型 CHO-K1 细胞中血小板 α II b 和 β 3 蛋白的合成; 流式细胞术检测突变型 CHO-K1 细胞膜和胞质 α II b 和 β 3 表达水平; 免疫荧光显微镜观察突变型 CHO-K1 中 α II b 和 β 3 的表达及分布。结果 该患儿为 II 型血小板无力症。基因测序发现 *ITGB3* 基因存在 2 个突变, 且尚未被报道。*ITGB3* c.1495 T>C 错义突变导致 β 3 蛋白亚基第 499 号半胱氨酸被精氨酸代替 (p.C499R); *ITGB3* c.1728 delC 移码突变导致 β 3 蛋白亚基第 577 号丝氨酸开始的氨基酸合成发生改变, 并在改变之后的第 92 个氨基酸终止。免疫印迹法结果为突变型 CHO-K1 细胞裂解液中均检测到 α II b 和 β 3 一级结构的合成表达。流式细胞术检测结果为突变型 CHO-K1 细胞表面及胞内 β 3 表达量缺如; 荧光显微镜检测结果为突变型 CHO-K1 细胞未见 β 3 蛋白亚基的分布。结论 *ITGB3* c.1495 T>C 和 c.1728delC 突变是该患儿的发病原因, 这 2 个突变并未影响血小板膜 β 3 蛋白亚基一级结构合成, 但影响其高级结构的表达和形成。

关键词: *ITGA2B*; *ITGB3*; 血小板无力症; 基因突变

中图分类号: R446

文献标志码: A

Study on molecular pathogenesis for a case of Glanzmann's thrombasthenia

GAO Bingjing, GONG Yan, QU Chenxue, YOU Ran, MIAO Linzi, LU Yao, LI Tao (Department of Clinical Laboratory, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular pathogenesis for a patient with Glanzmann thrombasthenia (GT). **Methods** The peripheral blood of a patient with Glanzmann's thrombasthenia was collected, and the genetic mutations were detected by gene sequencing technology. The mutant plasmids were prepared by PCR site-directed mutagenesis and transfected into CHO-K1 cells of Chinese hamster ovary to construct in vitro eukaryotic expression system. The expressions of α II b and β 3 protein subunits in CHO-K1 cells were detected by western blot. The expression levels of α II b and β 3 in cellular membrane and cytoplasm of CHO-K1 cells were detected by flow cytometry. The expression and distribution of α II b and β 3 in CHO-K1 cells were observed by immunofluorescent labeling under microscope. **Results** This patient was diagnosed with type II GT. Gene sequencing revealed two mutations in *ITGB3* gene which has not been reported in the literature. *ITGB3* c.1495 T>C missense mutation resulted in replacement of cysteine no.499 by arginine (p.C499R). *ITGB3* c.1728 delC code shift mutation resulted in a change in the amino acid synthesis initiated by the β 3 protein subunit serine no.577 and terminated by the 92nd amino acid following these changes. The results of western blotting showed that the synthesis and expression of primary structures of α II b and β 3 were detectable in the lysates of mutant CHO-K1 cells. The results of flow cytometry showed that no expression of β 3 on the surface and intracellular of mutant CHO-K1 cells was observed. Under fluorescence microscopy no distribution of β 3 protein subunit was displayed in mutant CHO-K1 cells. **Conclusion** The mutation of *ITGB3* c.1728 del C or *ITGB3* c.1495 T>C should be relevant to the cause of GT in this patient. The mutation of *ITGB3* c.1728 del C and *ITGB3* c.1495 T>C seems not to affect the formation of the primary structure of β 3 protein subunit, but did affect the formation of its high-level structure.

Key Words: *ITGA2B*; *ITGB3*; Glanzmann's thrombasthenia; gene mutation

血小板无力症 (Glanzmann's thrombasthenia, GT) 是一种常染色体隐性遗传病, 因血小板 *ITGA2B* 或 *ITGB3* 基因缺陷引起血小板膜上整合素 α II b β 3 的质和 (或) 量异常, 导致血小板聚集功能缺陷和血凝块收缩减弱, 患者主要临床表现为出血^[1-3]。依据 α II b β 3 含量可以将 GT 划分为 3 型: I 型为复合物 α II b β 3 含量不足正常血小板复合物 α II b β 3 表达量的 5%; II 型为其 5%~20%; III 型为其 50% 以

上, 也称变异性, 通常以 I 型较多, II 型次之, III 型少见。目前已发现 GT 患者 *ITGA2B* 和 *ITGB3* 基因存在多种类型突变^[4-11]。然而, 不同患者的发病机制并不一样^[4, 12-16]。本研究旨在探讨 1 例 GT 患儿的发病原因及分子发病机制, 进一步了解基因突变与血小板上各种生物分子结构与功能的关系, 为 GT 的治疗提供更多理论依据。

作者简介: 高丙晶, 1991 年生, 男, 硕士, 研究方向为血小板无力症发病机制、诊断治疗。

通信作者: 屈晨雪, 主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: qucx2012@163.com。

1 对象与方法

1.1 研究对象 患儿, 4 岁, 因下肢皮肤瘀斑于 2017 年 8 月 31 日就诊于我院儿科门诊。本研究经过北京大学第一医院伦理委员会批准, 伦理号为 (2019) 科研第 (47) 号。

1.2 主要仪器与试剂 FACS Calibur 流式细胞仪 (BD 公司); LB-Y-NJ4 血小板聚集仪 (北京普利生公司); DNA 自动提取仪 (厦门至善生物公司); western blot 电泳仪和电转仪 (Bio-Rad 公司); 细胞培养箱和离心机 (ThermoFisher 公司); ACL-TOP700 全自动凝血分析仪 (沃芬公司); 2720 Thermal Cycler PCR 反应仪 (ABI 公司) 等。

CHO-K1 细胞系为中国仓鼠卵巢细胞 k1 亚克隆, 由北京大学第一医院皮肤科杨勇教授惠赠; *ITGA2B* 质粒 (Sino Biological 公司); *ITGB3* 质粒 (上海柯雷生物科技有限公司); lipofectamine 3000 转染试剂盒 (Invitrogen 公司); 抗 CD61 抗体、抗 CD41 抗体、抗 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗、prism ultra protein ladder (10~180 kDa) 均购自 abcam 公司; FITC 标记的鼠抗人 CD41b 抗体、Percp 标记的鼠抗人 CD61 抗体、Isotype-PE、Isotype-Percp、Isotype-FITC 同型对照抗体均购自 BD 公司; PE 标记的鼠抗人 CD41 抗体 (贝克曼库尔特公司) 等。

突变引物由上海英潍捷基公司合成; 野生型和突变型质粒测序引物合成以及突变质粒测序验证均由北京天一辉远公司完成。

1.3 标本采集与凝血指标检测 采集患儿外周静脉血, 用于血小板聚集实验的血液以 800 r/min 离心 10 min, 用于凝血检测的血液以 3 000 r/min 离心 15 min, 用于基因提取实验的血液充分混匀并于 -80 ℃ 保存。用 ACL-TOP700 仪以凝固法检测凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶时间 (TT)、纤维蛋白原 (Fib); 以免疫比浊法检测 D 二聚体 (DD)、纤维蛋白降解产物 (FDP)、血管性血友病因子 (vWF)。

1.4 血小板检查 用 LH750 血细胞分析仪检测血小板数量。用 ADP (终浓度 3 μ mol/L)、胶原 (终浓度 3.33 μ g/mL) 和瑞斯托霉素 (终浓度 1.25 mg/mL) 作为血小板聚集诱导剂, 用 LB-Y-NJ4 血小板聚集仪进行血小板聚集功能试验, 测定 5 min 最大血小板聚集率。

1.5 流式细胞术检测血小板膜表面糖蛋白 以同型对照抗体设阴性对照, 健康人作为正常对照, 用抗 CD41、CD61、CD42b、CD42a 抗体通过流式细胞术检测

血小板表面 CD41、CD61、CD42b 及 CD42a 的表达。

1.6 基因组 DNA 提取与测序 用 Lab-Aid 824 DNA 提取试剂盒提取 DNA。测序基因包括复合物 α II b β 3 的基因所有外显子及其侧翼序列在内的血小板型出血性疾病相关的 44 个基因及其侧翼序列。通过下一代基因测序技术筛选致病基因并采用一代测序技术进一步验证致病基因位点。检索数据库 (1000gene 和 Exome Variant Server)、HGMD 和 PubMed 数据库以及 GT 专业数据库并查阅相关文献排除多态性。

1.7 体外真核表达系统构建 以 β 3 野生型质粒为模板, 选择 QuickChange XL 突变引物设计软件设计突变位点诱导引物, 引物序列如下, *ITGB3*-1495-F: 5-GATCCCAGTGTGACGCTCAGAGGAGGAC-3; *ITGB3*-1495-R: 5-GTCCTCCTCTGACGCTCACACTGGATC-3; *ITGB3*-1728-F: 5-CCAGTCGGATCACACAGGCAGTCCCC-3; *ITGB3*-1728-R: 5-GGGGACTGCCTGTGTGATCCGACTGG-3。PCR 体系如下: 5 $\times$ buffer 10 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L, 引物 (共包含 R+F) 2 μ L, PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶 1 μ L, β 3 质粒模板 1 μ L, 加双蒸水至 50 μ L。PCR 条件为 98 ℃ 10 s, 58 ℃ 15 s, 68 ℃ 8 min, 共 30 个循环。用 Qiagen 层析柱法置换体系液, 在置换体系液后产物中加入 10 U DPNI 内切酶以及反应液于 37 ℃ 消化野生型质粒模板 1 h。用氯化钙将突变质粒转化至大肠埃希菌 Top 10 感受态菌株中扩增培养并送测序。对于突变型质粒须经确认目标突变位点成功引入正确的突变, 且其他序列均正常。将克隆菌株加入至 10 mL LB 含氨苄青霉素的 LB 培养基摇床 220 转, 37 ℃ 培养 12 h, 用 TIANpure Midi Plasmid Kit 高纯度质粒小提中量试剂盒 (Tiangen 公司) 进行质粒提取转染。转染前一天传代并用无抗生素条件培养 CHO-K1 细胞, 待到细胞密度大约 80%, 按照 Lipofectamine 转染试剂说明书将野生型 α II b 质粒分别和野生型 β 3、1495 突变质粒、1728 突变质粒共转染 CHO-K1 细胞系, 转染后 5 h 更换为完全培养液, 48 h 后, 用含有 350 μ L 潮霉素和 2 μ L 嘌呤霉素的新鲜完全培养基 10 mL 进行培养和筛选单克隆细胞。获得稳定表达 WT、MT-1495、MT-1728 的真核表达系统。

1.8 免疫印迹实验 提取细胞总蛋白, 在还原条件下进行蛋白质电泳实验。转染野生质粒的 CHO-K1 细胞 (WT) 总蛋白为阳性对照, 以 MT-1495、MT-1728 突变体总蛋白为实验组, 分别用抗 α II b 抗体 (抗 CD41 抗体) 和抗 β 3 抗体 (抗 CD61 抗体) 进行

免疫印迹分析。配制 8% SDS-PAGE 分离胶,电泳条件为 80 V, 35 min 后调整电压和时间 120 V, 1 h 左右。将目标蛋白在恒流电 60 V 2.5 h 转移至 PVDF 膜, 5% BSA 封闭 1 h 后加入 1:1 000 稀释抗 CD61 兔单克隆抗体、1:100 稀释抗 CD41 兔多克隆抗体、1:5 000 稀释抗 β -actin 兔单克隆一抗, 于 4 °C 温育过夜。用 TBST 在室温下洗涤 3 次, 每次 5 min, 1:50 000 稀释辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗室温下温育 1.5 h, 用 ECL 化学发光检测条带并记录。研究目的蛋白亚基分子量差异大, 实验电泳和电转时间长, 为更好比较和观察分析, 实验中每个样本上样 2 个泳道。

1.9 流式细胞术实验 收集并过滤洗涤 3 次 WT、MT-1495、MT-1728 细胞, 用细胞计数板计数细胞, 每管分别加入约 10^5 个细胞。以 WT 为阳性对照, MT-1495、MT-1728 为实验组, 用抗 CD41b、CD61 抗体标记细胞进行流式细胞术分析。测定管和对照管分别加入相应 α II b 和 β 3 抗体 20 μ L 和同型对照抗体, 37 °C 温育 30 min, 加入 2 mL PBS, 以 1 500 r/min 离心 5 min 洗涤 1 次, 加入 500 μ L 1×PBS。用流式细胞仪检测共转染后 CHO-K1 细胞膜糖蛋白 α II b 和 β 3 蛋白的表达。检测细胞内 CD41 和 CD61 时用 4% 多聚甲醛固定细胞, 用 0.02% Tween 20 穿孔, 标记抗体并检测。

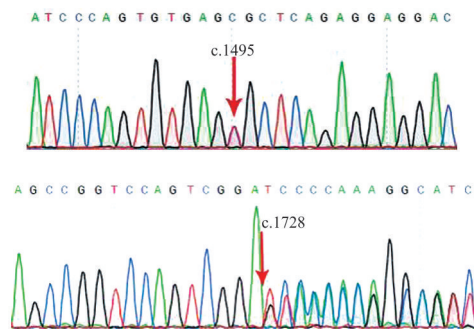
1.10 荧光显微镜实验 收集 WT、MT-1495、MT-1728 细胞洗涤 3 次。然后再以转染野生型质粒的 CHO-K1 (WT) 细胞为阳性对照, 以 MT-1495、MT-1728 突变体为实验组, 细胞固定破膜后用 CD41b 和 CD61 荧光抗体标记。4% 多聚甲醛固定 30 min 后洗涤 2 次; 封闭液 (5% BSA) 室温封闭 30 min; 洗涤后用 0.05% Tween 20 破膜 15 min, 洗涤后抗 CD61 抗体 (CD61-PerCP)、抗 CD41b-FITC 标记实验组, 用 FITC 标记的小鼠免疫球蛋白 G (mouse IgG-FITC) 抗体标记对照组; 温育 30 min 后洗涤。用含有 DAPI 的封片剂封片。在免疫荧光显微镜下观察荧光染色结果。

2 结果

2.1 实验室检查结果 该患儿 ADP 诱导血小板聚集率为 6.27%, 瑞斯托霉素诱导血小板聚集率为 58%, 胶原诱导血小板聚集率为 18.52%。CD42a、CD42b、CD41、CD61 分别为 97%、97.3%、11.80%、7.00%, 患儿血小板膜表面 CD41、CD61 表达分别为 11.8%、7.00%, 而健康人分别均 >99%。此外, 该患儿 vWF 检测结果为 108.1 U/mL, PT、APTT、TT、Fib、

DD、FDP、PLT 检测结果分别为 11.8 s、37 s、13.8 s、2.73 g/L、0.27 mg/L、2.3 mg/L、 218×10^9 /L。根据以上结果, 该患儿临床诊断为 II 型 GT。

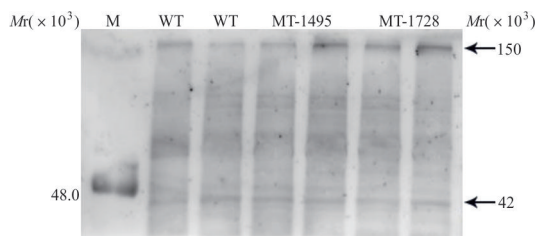
2.2 基因测序结果 该患儿发生 *ITGB3* 基因第 10 外显子 c.1495T>C 错义突变和第 11 外显子 c.1728delC 移码突变的复合杂合突变, 见图 1。*ITGB3* c.1495 T>C 错义突变导致 β 3 蛋白亚基第 499 号半胱氨酸被精氨酸代替 (p.C499R); 而 *ITGB3* c.1728 delC 移码突变导致 β 3 蛋白亚基第 577 号丝氨酸开始的氨基酸合成发生改变, 并在改变之后的第 92 个氨基酸终止 (p.Ser577ProfsTer92)。



注: 红色箭头分别示 *ITGB3* c.1495T>C 和 *ITGB3* c.1728delC。

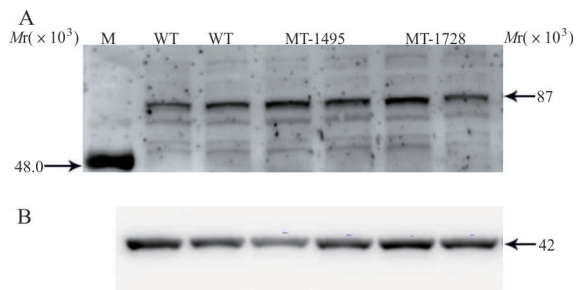
图 1 患儿 *ITGB3* 基因 c.1495T>C 和 c.1728delC 杂合突变

2.3 免疫印迹结果 WT、MT-1495、MT-1728 在相对分子量 (M_r) 大约 150 000 附近有 α II b 反应条带, 见图 2; 在 87 000 附近有 β 3 反应条带, 见图 3。



注: $M_r(\times 10^3)$ 150 为野生型 (WT) 和突变型 C499R (MT-1495)、S577P (MT-1728) 的 α II b 条带, $M_r(\times 10^3)$ 42 为内参 β -actin 条带。

图 2 野生型和突变型 CHO-K1 细胞总蛋白中 α II b 条带

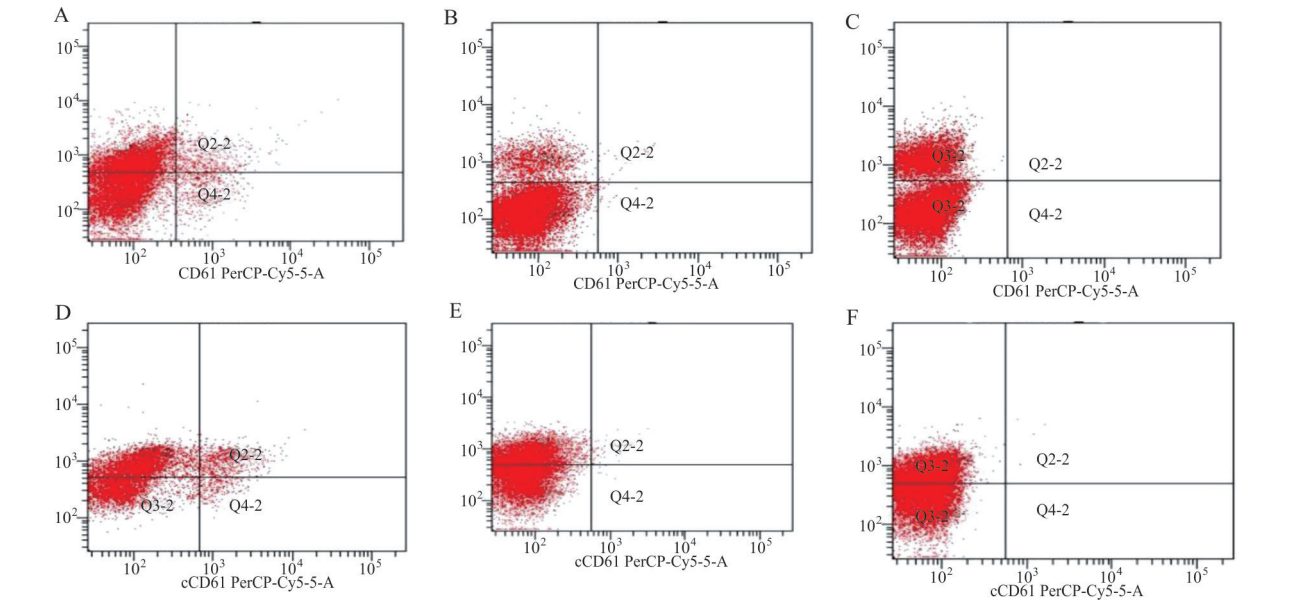


注: A 中 $M_r(\times 10^3)$ 87 分别为野生型 (WT) 和突变型 C499R (MT-1495)、S577P (MT-1728) β 3 条带, B 为内参 β -actin 条带。

图 3 野生型和突变型 CHO-K1 细胞总蛋白中 β 3 条带

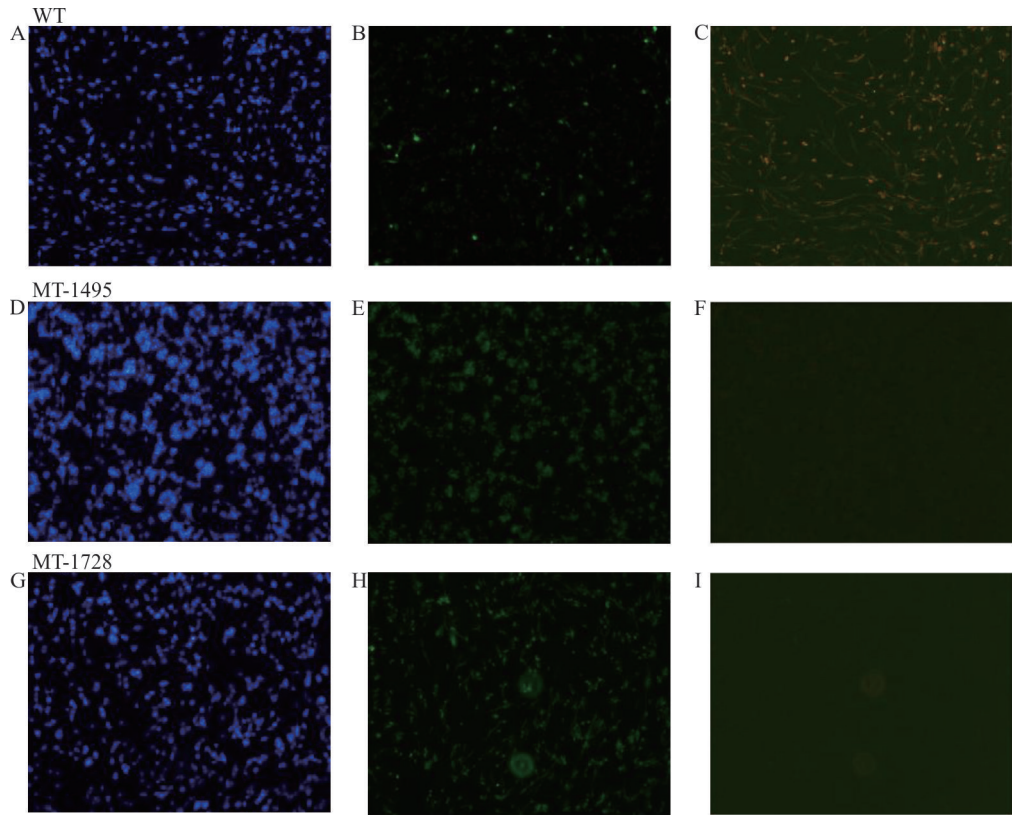
2.4 流式细胞术分析 见图 4。结果显示,WT 细胞膜和胞内均有 CD41b 和 CD61 表达。MT-1495、MT-1728 突变型细胞膜和胞内均存在 α II b 蛋白亚基表达,但细胞膜和胞内均不存在 β 3 蛋白亚基高级结构表达。

2.5 荧光显微镜结果 WT 细胞体存在 α II b 蛋白亚基和 β 3 蛋白亚基表达。MT-1495、MT-1728 突变体胞膜和胞内存在高级结构 CD41b 表达,而高级结构 CD61 蛋白不表达,用荧光显微镜(日本 Olympus 公司)在 200 倍视野下取图,结果见图 5。



注:A、B、C 分别为野生型质粒共转染的 CHO-K1、野生型质粒 α II b 和 1495 突变质粒共转染的 CHO-K1、野生型质粒 α II b 和 1728 突变质粒共转染的 CHO-K1 的细胞膜 α II b/ β 3 表达,D、E、F 分别为其细胞内 β 3 表达。

图 4 WT-CHO-K1、MT-1495、MT-1728 细胞胞膜和胞内 α II b/ β 3 表达情况



注:A、D、G 为 DAPI 染色,B、E、H 为 CD41b-FITC 标记,C、F、I 为 CD61-PerCP 标记。

图 5 WT、MT-1495、MT-1728 细胞免疫荧光染色

3 讨论

本研究收集到的患儿主要临床表现为瘀斑,常规凝血检查和血小板计数结果均正常,而血小板膜表面糖蛋白 GP II b/GP III a 表达减少,根据诊断标准,临床诊断为 II 型 GT。遗憾的是本次实验未收集到患儿父母的血标本,因而不能判断出该患儿复合杂合突变基因的来源。为明确其分子发病机制,进一步检测该患儿基因发现,该患儿 *ITGB3* 存在 2 个基因突变位点,分别为 *ITGB3* c.1495 T>C、c.1728delC。经检索数据库(1000gene 和 Exome Variant Server)、HGMD 和 PubMed 数据库排除多态性,同时检索 GT 专业数据库并查阅相关文献^[17-18],发现 *ITGB3* c.1495 T>C、c.1728delC 基因突变尚未被报道,属于新突变。*ITGB3* c.1495 T>C 基因突变位于第 10 外显子,为错义突变导致 $\beta 3$ 蛋白亚基第 499 号的半胱氨酸被精氨酸代替;*ITGB3* c.1728 delC 位于第 11 外显子上为移码突变,导致 $\beta 3$ 蛋白亚基第 577 号丝氨酸开始的氨基酸合成发生改变,并在改变之后的第 92 个氨基酸终止(p.Ser577ProfsTer92)。*ITGB3* c.1495 T>C 突变对其理化性质和二硫键结构影响大,*ITGB3* c.1728 delC 突变可能导致其后蛋白质多处的二硫键结构破坏和 N 段连接的天冬酰胺序列缺失以及磷酸酪氨酸残基修饰缺失,从而影响该膜糖蛋白正常生物功能的发挥。为验证上述推测,本研究通过构建体外真核表达系统来阐明这 2 个新突变可能的致病机制。首先,用 CHO-K1 细胞构建野生型和突变型的表达载体。利用这些表达载体观察 $\beta 3$ 突变型的表达是否正常。结果显示细胞裂解液免疫印迹法在还原条件下同时检测到 α II b 和 $\beta 3$ 的一级结构的合成表达,流式细胞术和荧光免疫显微镜检查提示 α II b 高级结构有表达但 $\beta 3$ 高级结构不表达。推测 *ITGB3* c.1728 del C 和 *ITGB3* c.1495 T>C 突变可能并未影响 $\beta 3$ 蛋白亚基一级结构的形成,但却导致一级结构的 $\beta 3$ 不能经过正常的加工修饰形成 $\beta 3$ 蛋白亚基的高级结构,因而血小板膜糖蛋白 *ITGB3* c.1495 T>C 和 c.1728 delC 基因突变导致该患儿 GT 的发生。这种由基因突变所致的结构异常也提示该突变不能形成正常的抗原表位,也就不能被抗体正常结合识别。同时,该突变的致病机制也可能是 α II b $\beta 3$ 复合物的折叠错误使其容易降解或者因未形成某些关键空间构象而同时引起其他异常,比如正常转运过程受阻而导致膜上 α II b $\beta 3$ 复合物减少及血小板

功能异常。

尽管本次所研究突变位点相邻近基因位点突变尚未发现报道,但有研究报道发生在 α II b calf-1 和 calf-2 区的部分突变以及发生在外显子 25 上的缺失/插入突变等导致的 α II b $\beta 3$ 功能异常,从而引发 GT 的病例^[2]。报道显示尽管这些突变可能影响部分氨基酸的编码以及部分氨基酸数量的异常,却并没有影响到 α II b 和 $\beta 3$ 蛋白亚基合成,也并没有影响到 α II b $\beta 3$ 复合物在细胞质中的形成,但影响其在细胞膜中的表达,原因是形成的 α II b $\beta 3$ 大部分滞留在内质网。有研究者同样发现有些基因变异导致复合物能在细胞质内形成,但未必会准确转运至细胞膜上发挥生理功能,原因可能为基因突变后所编码的 α II b 亚基和或 $\beta 3$ 亚基所形成的复合物 α II b $\beta 3$ 复合物不能正确完成蛋白质翻译后修饰过程,这阻碍它的成熟和细胞表达,从而导致其在内质网中大量滞留或被降解。此外,某个亚基的某些类型的突变可能会对突变亚基和另外一个野生型亚基的结合产生显性抑制效应,从而影响 α II b $\beta 3$ 复合物形成并正确转运至细胞膜上^[19]。

上述研究结果和我们的研究结果都在一定程度揭示 GT 发病机制,但具体 α II b 和 $\beta 3$ 蛋白修饰和装配以及向细胞膜转运方面的机制并未阐明。越来越多的 α II b $\beta 3$ 热点基因变异被证实是 GT 发病原因,GT 患儿血小板 α II b $\beta 3$ 基因变异的分子特点将为研究血小板 α II b $\beta 3$ 的蛋白结构和功能关系以及相关信号分子和信号通路研究提供重要信息。但这些突变造成的蛋白亚基结构变化和明确的转运机制障碍尚未明确。同时,也需要进一步对 GT 基因层面异常所导致的具体的蛋白合成与加工修饰以及相应的信号通路的研究,这对于不断深化该疾病的认识将很有帮助,新的治疗方法也或许将从中被发现并使 GT 患儿受益。体外构建真核表达系统也将为 α II b $\beta 3$ 的基因突变和 α II b 和 $\beta 3$ 蛋白亚基的结构与功能之间内在关系的研究提供更多的方法和模型。

4 参考文献

- [1] Bennet JS. The molecular biology of platelet membrane proteins [J]. Semin Hematol, 1990, 27(2): 186-204.
- [2] Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia [J]. Orphanet J Rare Dis, 2006, 1:10.
- [3] French DL, Seligsohn U. Platelet glycoprotein II b/III a receptors and Glanzmann's thrombasthenia [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(3): 607-610.

- [4] Arias-sagado EG, Butta N, Gonzalez-Manchon C, *et al.* Competition between normal [674C] and mutant [674R] subunits; role of the molecular chaperone BiP in the processing of GP II b-III a complexes [J]. Blood, 2001, 97(9): 2640-2647.
- [5] Bury L, Zetterberg E, Leinoe B, *et al.* A novel variant Glanzmann thrombasthenia due to co-inheritance of a loss- and a gain-of-function mutation of *ITGB3*; evidence of a dominant effect of gain-of-function mutations [J]. Haematologica, 2018, 103(6): e259-e263.
- [6] Daly ME, Dawood BB, Lester WA, *et al.* Identification and characterization of a novel P2Y₁₂ variant in a patient diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European MCMDM-1VWD study [J]. Blood, 2009, 113(17): 4110-4113.
- [7] Kannan M, Ahmad F, Yadav BK, *et al.* Molecular defects in *ITGA2B* and *ITGB3* genes in patients with Glanzmann thrombasthenia [J]. J Thromb Haemost, 2009, 7(11): 1878-1885.
- [8] Nelson EJ, Nair SC, Peretz H, *et al.* Diversity of Glanzmann thrombasthenia in southern India: 10 novel mutations identified among 15 unrelated patients [J]. J Thromb Haemost, 2006, 4(8): 1730-1737.
- [9] Nurden AT, Fiore M, Nurden P, *et al.* Glanzmann thrombasthenia: a review of *ITGA2B* and *ITGB3* defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models [J]. Blood, 2011, 118(23): 5996-6005.
- [10] Reichert N, Seligsohn U, Ramot B. Clinical and genetic aspects of Glanzmann's thrombasthenia in Israel: report of 22 cases [J]. Thromb Diath Haemorrh, 1975, 34(3): 806-820.
- [11] Toogeh G, Sharifian R, Lak M, *et al.* Presentation and pattern of symptoms in 382 patients with Glanzmann thrombasthenia in Iran [J]. Am J Hematol, 2004, 77(2): 198-199.
- [12] Xiong JP, Stehle T, Zhang R, *et al.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin α V β in complex with an Arg-Gly-Asp ligand [J]. Science, 2002, 296(5565): 151-155.
- [13] Tao J, Arias-Salgado EG, Gonzalez-Manchon C, *et al.* A novel (288delC) mutation in exon 2 of GP II b associated with type I Glanzmann's thrombasthenia [J]. Br J Haematol, 2000, 111(1): 96-103.
- [14] Rosenberg N, Yatuv R, Sobolev V, *et al.* Major mutations in calf-1 and calf-2 domains of glycoprotein II b in patients with Glanzmann thrombasthenia enable GP II b/III a complex formation, but impair its transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus [J]. Blood, 2003, 101(12): 4808-4815.
- [15] Rosenberg N, Hauschner H, Peretz H, *et al.* A 13-bp deletion in α (II b) gene is a founder mutation that predominates in Palestinian-Arab patients with Glanzmann thrombasthenia [J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(12): 2764-2772.
- [16] Pillois X, Fiore M, Heilig R, *et al.* A novel amino acid substitution of integrin α II b in Glanzmann thrombasthenia confirms that the N-terminal region of the receptor plays a role in maintaining β -propeller structure [J]. Platelets, 2013, 24(1): 77-80.
- [17] Nurden AT, Nurden P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function [J]. Br J Haematol, 2014, 165(2): 165-178.
- [18] Park KJ, Chung HS, Lee KO, *et al.* Novel and recurrent mutations of *ITGA2B* and *ITGB3* genes in Korean patients with Glanzmann thrombasthenia [J]. Pediatr Blood Cancer, 2012, 59(2): 335-338.
- [19] Nurden AT, Freson K, Seligsohn U. Inherited platelet disorders [J]. Haemophilia, 2012, 18 Suppl 4: 154-160.

(收稿日期:2019-06-03)

(本文编辑:王海燕)